



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

---

POSGRADO EN BIOCENCIAS

EVALUACIÓN DE SISTEMAS AUTOTRÓFICOS Y  
HETEROTRÓFICOS (BIOPELÍCULAS Y BIOFLÓCULOS)  
SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA, FISIOLÓGÍA  
DIGESTIVA Y RESPUESTA INMUNE EN LA  
MATERNIZACIÓN Y PREENGORDA INTENSIVA DEL  
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*).

TESIS OPCION II

(COMPILACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS)

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta:

MANUEL DE JESUS BECERRA DORAME

Hermosillo, Sonora, México

13 de Agosto de 2012

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

---

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EVALUACIÓN DE SISTEMAS AUTOTRÓFICOS Y  
HETEROTRÓFICOS (BIOPELÍCULAS Y BIOFLÓCULOS)  
SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA, FISIOLOGÍA  
DIGESTIVA Y RESPUESTA INMUNE EN LA  
MATERNIZACIÓN Y PREENGORDA INTENSIVA DEL  
CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*).**

TESIS OPCION II

(COMPILACIÓN DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS)

Que para obtener el grado de:

**DOCTOR EN BIOCENCIAS**

Presenta:

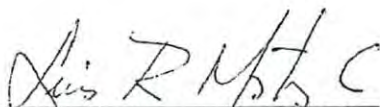
**MANUEL DE JESUS BECERRA DORAME**

Hermosillo, Sonora, México

13 de Agosto de 2012

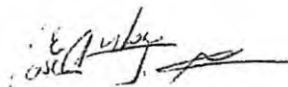
## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Evaluación de Sistemas Autotróficos y Heterotróficos (Biopelículas y Bioflóculos), Sobre la Respuesta Productiva, Fisiología Digestiva y Respuesta Inmune en la Maternización y Preengorda Intensiva del Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*)” presentada por el M.C. Manuel de Jesús Becerra Dórame, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Asesor



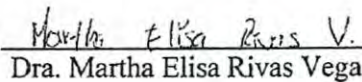
Dr. José Antonio López Elías

Asesor/Sinodal



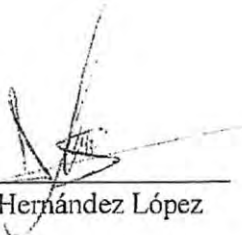
Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal



Dra. Martha Elisa Rivas Vega

Sinodal



Dr. Jorge Hernández López

Sinodal



## **DEDICATORIA**

**A DIOS:** porque con su gracia tengo mi vida, gracias a Él tengo salud y la fuerza suficiente para seguir avanzando en mis estudios y en mis proyectos personales.

**A MIS PADRES:** porque gracias a su soporte abnegado son lo más preciado que tengo, ya que ustedes siempre me han alentado con su amor y comprensión a lo largo de toda mi vida.

**A MIS HERMANOS:** A Ustedes porque a pesar de nuestra personalidad diferente, sin mis hermanos mi vida sería incompleta.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por su apoyo económico otorgado durante el periodo de estudios de posgrado.

A la **Universidad de Sonora** siendo mi alma mater por todo el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas** y de igual forma al **Posgrado en Biociencias** por la oportunidad que me brindaron para llevar a cabo mis estudios.

De manera sincera y muy especialmente a mi director de tesis **Dr. Luis Rafael Martínez Córdova**, por la paciencia y la enorme confianza que deposito en mi para realizar este proyecto de investigación.

A mi comité de tesis: Dr. José Antonio López Elías, Dr. Marco Antonio López Torres y Dra. Martha Elisa Rivas Vega y Dr. Jorge Hernández López por el importante apoyo a lo largo de este proyecto y por sus atinados comentarios y sugerencias.

A mis apreciables amigos de generación: Gabriel, Carlos, Elizabeth y Rocío; aunque nuestros caminos probablemente serán diferentes siempre atesoraré las vivencias y buenos momentos que pasamos.

De manera apreciable a las Biólogas Perla Urquidez y Angélica Moreno, aunque somos de generaciones diferentes, me mostraron que eso no tiene importancia alguna, siendo ambas un excelente ejemplo de amistad y apoyo, me siento muy agradecido y dichoso de que nuestros caminos se hayan cruzado.

## INDICE GENERAL

	<b>PÁGINA</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	1
<b>II. OBJETIVO GENERAL</b>	5
II.1 Objetivos particulares	5
<b>III. METODOLOGÍA</b>	6
III.1 Diseño experimental	6
III.2 Descripción del sistema autotrófico	7
III.3 Descripción del sistema heterotrófico	7
III.4 Descripción del sistema control	8
III.5 Evaluación de la respuesta productiva	11
III.5.1 Crecimiento	11
III.5.2 Supervivencia, biomasa y factor de conversión alimenticia	11
III.6 Parámetros fisicoquímicos	11
III.7 Concentración celular de microalgas	11
III.8 Actividad enzimática digestiva	12
III.8.1 Proteína soluble	12
III.8.2 Actividad Tipo-Tripsina	12
III.8.3 Actividad de Amilasas	12
III.8.4 Actividad de Lipasas	13
III.9 Parámetros hemáticos y actividad superóxido dismutasa (SOD)	13
III.10 Análisis proximal de los bioflóculos	14
III.10.1 Proteína	14
III.10.2 Lípidos	14
<b>IV. RESULTADOS</b>	16
<b>V. CONCLUSIONES</b>	21
<b>VI. LITERATURA CITADA</b>	22

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Vista aérea del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), unidad Guaymas, Sonora.	6
2	Sistema de cultivo basado en organismos autótrofos.	7
3	Sistema de cultivo basado en organismos heterótrofos.	8
4	Sistema de cultivo control.	9
5	Sistema de cultivo autotrófico (A) y sistema de cultivo heterotrófico.	10



## RESUMEN

En base a la importancia que tienen los microorganismos en la cadena trófica de sistemas acuáticos, incluyendo estanques acuícolas, se llevó a cabo una investigación experimental para evaluar el efecto de microorganismos autótrofos y heterótrofos asociados a biopelículas y bioflóculos sobre la respuesta productiva, actividad enzimática digestiva y condición fisiológica (nutricional e inmune) de *Litopenaeus vannamei* durante su maternización y preengorda intensivas en tinas de plástico (120 y 300 L respectivamente), sin recambio de agua y sin *Artemia*. Se utilizó un diseño experimental simple en un arreglo completamente al azar con tres réplicas por tratamiento. Los tratamientos consistieron en: 1. Un sistema basado en la promoción de organismos autotróficos (microalgas) como base de la productividad primaria; 2. Un sistema basado en la promoción de organismos heterotróficos (bacterias) como la base de la productividad primaria y 3. Un control que fue el sistema tradicional de cultivo sin el uso de biopelículas y bioflóculos. La promoción de organismos autotróficos o heterotróficos se basó en el manejo de la proporción carbono:nitrógeno, la exposición a la luz y la incorporación de sustratos fijos (malla plástica) y flotantes (salvado de trigo) en los sistemas. La respuesta productiva en ambas fases de desarrollo, solo se vio mejorada en términos de sobrevivencia, siendo ésta mejor en el sistema autotrófico. El factor de conversión alimenticia fue muy bajo todos los sistemas. La concentración de microalgas y de bacterias en los sistemas autotrófico y heterotrófico, respectivamente fue alta. Los niveles de proteína y lípidos de los bioflóculos constituyen un aporte nutricional significativo a los organismos cultivados. La actividad enzimática pareció ser ligeramente mejor en los sistemas con promoción de microorganismos, al igual que la condición fisiológica, tanto en términos de concentración de proteína, colesterol y acilglicéridos como en la concentración de superóxido dismutasa como único indicador de condición inmune. Se concluye que es factible la maternización y preengorda en sistemas en donde se promueve el desarrollo de organismos tanto autotróficos como heterotróficos y que en estos es posible obtener una mayor sobrevivencia y organismos aparentemente con una mejor condición fisiológica. Esto último requiere ser ratificado con estudios complementarios.

## ABSTRACT

Considering the importance of microorganisms on the trophic chain in aquatic ecosystems, including aquaculture ponds, an experimental study was conducted to evaluate the effect of autotrophic and heterotrophic microorganisms associated to biofilms and bioflocs, on the production response, enzymatic activity, and physiological condition (nutritional and immune) of *Litopenaeus vannamei* during its intensive nursery and pre-grown in plastic containers (120 and 300 L, respectively), without water exchange and without *Artemia*. A simple and completely randomized experimental design with three replicates per treatment was performed. The treatments consisted of: 1. A culture system based on the promotion of autotrophic microorganisms (microalgae) as the base of primary productivity; 2. A culture system based on the promotion of heterotrophic microorganisms (bacteria), as the base of primary productivity; and 3. A control, which was the traditional system without the use of biofilms or bioflocs. The promotion of autotrophic or heterotrophic microorganisms was based on the management of the carbon:nitrogen rate, the exposure to sunlight, and the use of fix (plastic mesh) or floating (wheat brand) substrates. The production response of shrimp in both phases was improved in the microbial based system, only in terms of survival, which was higher in the autotrophic system. The feed conversion ratio was very low in all the systems. The concentration of microalgae and bacteria in the autotrophic and heterotrophic systems, respectively, was high. The protein and lipid content of bioflocs, constitute an important nutritional source for the farmed organisms. The enzymatic activity seemed to be slightly better in the microbial based systems, as well as the physiological conditions, in terms of protein, glucose, cholesterol, acilglycerides, and superoxide-dismutase, as the unique indicator of immune condition evaluated. It is concluded that the nursery and pre-grown of white shrimp in microbial based systems is feasible, and that it is possible to get good survivals and organisms apparently with a better physiological conditions. This needs to be confirmed by additional studies.

## I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Uno de los retos más importantes de la acuicultura actual, es el de producir organismos sanos y nutricionalmente adecuados al menor costo económico y con el menor impacto posible al medio ambiente. Varios son los aspectos en los que se debe avanzar para lograr este propósito de la sustentabilidad de la acuicultura. Indudablemente que uno de los más importantes es el manejo adecuado del alimento y las estrategias de alimentación, considerando que el alimento formulado es el costo operativo más alto de la actividad, y al mismo tiempo una de las principales fuentes de contaminación en los ecosistemas receptores de los efluentes de granjas acuícolas en general y camarícolas en particular (Tacon, 2002; Martínez Córdova *et al.*, 2009).

El avance científico en nutrición acuícola hizo que durante algunos años el costo del alimento suplementario bajara para ubicarse entre un 30 y un 40% de los costos operativos de la camaricultura (Zendejas-Hernández, 1994). Sin embargo en los últimos años, ha habido un aumento muy significativo en el precio de la harina y aceite de pescado, que son insumos esenciales como fuente de proteína y lípidos respectivamente. Esto ha llevado a que nuevamente los precios de los alimentos camarícolas hayan aumentado para ubicarse actualmente en el 50 % o más de los costos operativos totales de la actividad (Tacon, 2008; Sookying and Allen (2011)).

Uno de los aspectos en los que se puede avanzar para enfrentar esta situación, es en el manejo, evaluación y aprovechamiento de la productividad natural en los sistemas de cultivo. Ha sido ampliamente reportada la importancia que el alimento natural puede tener en la nutrición de los organismos cultivados. Desde investigaciones realizadas hace más de 20 años (Rubrigh *et al.*, 1981; Yufera *et al.*, 1984; Leber and Pruder, 1988), hasta otras más recientes (Jory, 2000; Martinez-Cordova *et al.*, 2002, 2003, Tacon *et al.*, 2000; Audelo-Naranjo *et al.* 2010, 2011; Porchas-Cornejo *et al.*, 2011), se ha demostrado el importante rol que diversos elementos de las comunidades bióticas juegan en la nutrición del camarón en cultivo. Esta contribución puede llegar a ser hasta de un 70% de los requerimientos del organismo, dependiendo de diversos factores como lo son: el estadio de desarrollo, la intensificación del sistema de cultivo, las condiciones ambientales, la calidad del agua, el tipo de comunidades



predominantes, entre otros. A pesar de estos conocimientos no se ha podido lograr obtener hasta ahora una ventaja práctica de ellos, que se refleje en beneficios económicos o ecológicos importantes. Esto se debe básicamente a la dificultad de manejar adecuadamente estas comunidades y lograr mantenerlas en niveles tales que sean realmente un aporte significativo en la nutrición del organismo cultivado (White, 1986).

Los principales productores primarios en ambientes acuáticos son: los micro organismos autótrofos (especialmente microalgas), heterótrofos (sobre todo bacterias), y el fitobentos (mayormente las macrófitas). El fitoplancton es en la mayoría de los casos, la comunidad que tiene la aportación más importante en cuanto a biomasa, aunque las bacterias pueden llegar a representar una contribución significativa, cuando son manejadas adecuadamente.

De acuerdo con Horowitz y Horowitz (2002), los micro organismos afectan todos los aspectos biológicos dentro de un ecosistema acuático, como generadores o consumidores de oxígeno disuelto, reciclando nutrientes, o como parte del alimento de organismos mayores. Estos organismos son pequeños, pero se multiplican rápidamente y son capaces de usar prácticamente cualquier compuesto orgánico para su crecimiento. También son importantes en la manutención de la calidad del agua, como mediadores del impacto ambiental de los efluentes y como control de agentes patógenos (Decamp *et al.*, 2002; Moss 2002).

La investigación científica moderna ha demostrado que en los sistemas de cultivos intensivos de camarón los micro organismos sobre todo organismos autótrofos no solo pueden contribuir a la manutención de la calidad del agua (Ebeling *et al.*, 2006; Samocha *et al.*, 2007), sino que la productividad natural en este tipo de sistemas puede sustentar una parte significativa del crecimiento de los camarones (Ballester *et al.*, 2003; Burford *et al.*, 2004). Avnimelech (1999) menciona que la alimentación de organismos cultivados puede ser mejorada mediante un mayor uso de alimento natural el cual está presente en el medio de cultivo, reduciendo así la necesidad del suministro exógeno de alimento, y abatiendo significativamente los costos de producción, además menciona que los organismos heterotróficos presentes en el sistema en forma de flóculos microbianos utilizan el nitrógeno amoniacal originado por la excreta de los animales, y la descomposición de la materia orgánica presente, para la producción de biomasa la cual se considera una fuente importante de proteína.

Debido a su pequeño tamaño, los micro organismos no pueden ser eficientemente aprovechados por los camarones o peces, en forma directa de la columna de agua; sin embargo si pueden serlo cuando se encuentran adheridos a superficies fijas o flotantes, es decir formando biopelículas (biofilms) o bioflóculos, respectivamente.

Los biofilms o biopelículas pueden ser definidos como un consorcio de micro organismos (autótrofos y heterótrofos), como lo son bacterias, cianobacterias, microalgas, protozoarios, y otros, asociadas a una matriz orgánica formada sobre superficies sumergidas (palos, raíces, piedras, telas, mallas, etc.).

Para los bioflóculos, el concepto es básicamente el mismo pero en este caso los organismos están asociados a superficies flotantes, ya sea que se encuentren de manera natural (partículas de detritus, heces, ramas, etc.) o sean introducidas intencionalmente en el sistema (salvado de trigo, paja, bagazo de caña, etc.).

Estudios con peces de agua dulce y camarones demuestran que las biopelículas, contribuyen a mejorar su producción acuícola por su importante aporte de nutrientes, lo que da como resultado un aumento en la sobrevivencia y el crecimiento de los organismos cultivados.

Algunos autores como De Schryver *et al.* (2009), han establecido las bases para el manejo adecuado de bioflóculos. Igualmente se ha documentado el valor agregado que estos bioflóculos tienen para el cultivo de camarones (Thompson *et al.* 2002; Moss and Moss, 2004).

En algunos países de Sudamérica como Brasil se ha estado experimentando con diversos micro organismos como parte de biofilms en estanques de cultivo de camarón, donde se han obtenido resultados satisfactorios, ya que se ha observado que estos tapetes microbianos son una excelente fuente de alimento por su aporte de proteínas y lípidos, así como también se ha visto que estos desempeñan un papel fundamental en la manutención de la calidad del agua (Ballester *et al.*, 2007, 2010).

El alimento natural, incluyendo bacterias, no solamente tiene un efecto positivo en la respuesta productiva de, camarones y peces bajo cultivo, sino además influye sobre su condición nutricional y su estado inmune. En el primer caso por el aporte de nutrientes de alta calidad (Porchas-Cornejo *et al.*, 2011) y en el segundo, porque el consumo de bacterias no patógenas, tales como los probióticos, incentiva la respuesta inmune de los organismos, al activar sus mecanismos de defensa, pero sin causar enfermedad; esta respuesta incentivada es



capaz de funcionar también contra bacterias o virus patógenos, en caso de que se presenten (Chiu *et al.*, 2007). Los trabajos sobre el efecto de la ingesta de micro organismos sobre el estado inmune, están referidos por lo general a probióticos comerciales que incluyen a una o varias bacterias específicas (Tseng *et al.*, 2009). Es necesario saber si esto funciona también para bioflóculos o biopelículas en donde se asocian una gran cantidad de micro organismos de diversas especies, además de metazoarios.

La condición nutricional de organismos cultivados, no es solamente consecuencia del alimento ingerido, sino además de la fisiología digestiva de los mismos, la cual a su vez puede verse modificada por diversos factores internos y externos entre los que se incluyen las condiciones ambientales, la calidad de los nutrimentos consumidos, así como de los cambios metamórficos (D'Abramo *et al.*, 1997; Ziaei-Nejad, 2006; Zhou *et al.*, 2009).

Dentro del proceso del cultivo de camarón, son de fundamental importancia la maternización y la preengorda de los organismos. Se conoce como maternización a la fase en que se lleva a los organismos desde post larva 1 (Pl<sub>1</sub>) hasta post larva 10 a 20 (Pl<sub>10</sub> a Pl<sub>20</sub>) después de lo cual, se inicia la etapa de engorda en los cultivos de una sola fase, o la preengorda, en los de dos fases. En esta última, los organismos son llevados hasta una talla de 0.5 a 1 g, para luego ser engordados. En ambas fases, maternización y preengorda, la alimentación es uno de los aspectos de mayor importancia. Para el primer caso se inicia con microalgas y zooplancton (normalmente Artemia), en el segundo se utiliza Artemia al inicio y posteriormente se substituye por alimento formulado micro encapsulado o peletizado. Los costos operativos de la alimentación en ambas etapas son importantes, sobre todo por el costo de la Artemia y los alimentos micro encapsulados. Actualmente se ha tratado de evaluar la factibilidad de utilizar micro organismos como fuente de alimentación tanto en la maternización como en la preengorda (Ballester *et al.*, 2010, 2011). Con esto se contribuiría no solo a mejorar la factibilidad económica de la actividad, sino también a minimizar su potencial impacto ambiental, así como a obtener organismos sanos y con mayor resistencia a enfermedades.

## **II. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el desempeño productivo, condición nutricional, actividad enzimática digestiva y condición inmune de *Litopenaeus vannamei* durante su maternización y preengorda intensivas, en sistemas autotróficos y heterotróficos con biopelículas y bioflóculos.

### **II.1 Objetivos particulares.**

- Evaluar el crecimiento, supervivencia y FCA de los camarones cultivados en sistemas autotróficos y heterotróficos, durante la maternización y la pre-engorda intensivas.
- Evaluar la composición proximal de los organismos desarrollados en las biopelículas y bioflóculos, en ambos sistemas.
- Evaluar la actividad enzimática digestiva, condición nutricional y respuesta inmune del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), en cada etapa y en cada uno de los dos sistemas.
- Caracterizar la comunidad microbiana presente en los cultivos heterotróficos.

### III. METODOLOGÍA.

Se hace una descripción general de la metodología empleada. Los detalles metodológicos están incluidos en los correspondientes 3 artículos científicos que surgieron del estudio y que se compilan y discuten como requisito para la obtención del grado.

#### III.1 Diseño experimental.

Este experimento fue conducido en el Centro de Investigación Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Unidad Guaymas, en la ciudad de Guaymas, Sonora. (Figura 1).



Figura 1. Vista aérea del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), unidad Guaymas, Sonora.

Se utilizó un diseño experimental simple en un arreglo completamente al azar con tres réplicas por tratamiento, tanto para la maternización como para la preengorda. Las unidades experimentales consistieron en tanques de plástico con una capacidad de 120 litros y 300 litros respectivamente. Los tanques fueron llenados 15 días antes de empezar con el experimento y se les agregaron nutrientes orgánicos e inorgánicos (según el tratamiento) para que las biopelículas y flóculos bacterianos tuviera oportunidad de formarse.



### III.2 Descripción del sistema autotrófico.

Este sistema de cultivo fue diseñado para que la productividad primaria estuviera basada fundamentalmente en microalgas (Figura 2); es por ello que al principio del experimento y durante el mismo, la razón Carbono:Nitrógeno fue ajustada a un 5:1 y la razón Nitrógeno:Fósforo a un 10:1 respectivamente, utilizando para ello un fertilizante agrícola (Urea + Fosfato de amonio). Se adicionaron al cultivo mallas plásticas tipo mosquitero a razón de  $0.25\text{m}^2/\text{m}^3$ , así como 25 g de salvado de trigo; con el objeto de que los micro organismos presentes tuvieran un sustrato al cual adherirse para formar las biopelículas y bioflóculos, respectivamente.

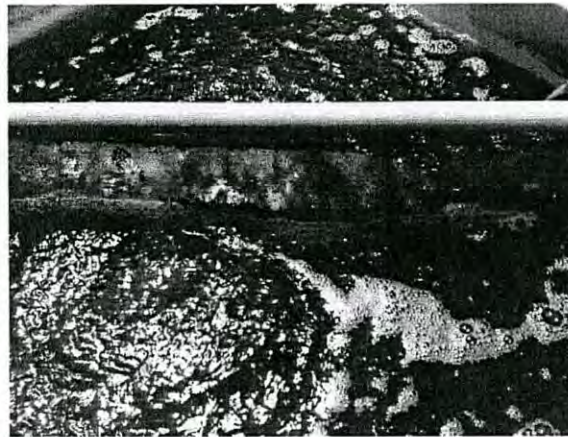


Figura 2. Sistema de cultivo basado en organismos autótrofos.

### III.3 Descripción del sistema heterotrófico.

Este sistema de cultivo fue diseñado para que la productividad primaria estuviera basada principalmente en bacterias heterotróficas (Figura 3), es por ello que la razón Carbono:Nitrógeno fue ajustada a un 20:1 utilizando 100 g de melaza al principio del experimento y añadiendo las cantidades necesarias para mantener esta relación durante el mismo. Se adicionaron al cultivo mallas mosquiteras con el objeto de que los micro organismos presentes tuvieran un sustrato al cual adherirse para formar las biopelículas; además se incorporaron 25 gramos de salvado de trigo una vez por semana para la formación de los flóculos bacterianos. Las unidades experimentales fueron cubiertas con malla sombra

para minimizar la exposición de los cultivos a la irradiación solar y de esta manera evitar en lo posible la proliferación de organismos fotoautotróficos.



Figura 3. Sistema de cultivo basado en organismos heterótrofos.

#### **III.4 Descripción del sistema control.**

Este sistema de cultivo, que correspondería a un sistema tradicional, fue diseñado para que la productividad primaria fuera a base de microalgas (Figura 4), es por ello que la razón Carbono:Nitrógeno fue ajustada a un 5:1 utilizando un fertilizante agrícola. Sin embargo a diferencia de los sistemas anteriores éste no conto con la adición de mallas mosquiteras, ni de salvado de trigo, es por ello que la formación de biopelículas y bioflóculos fue limitada.





Figura 4. Sistema de cultivo control.

En la etapa de maternización se sembraron postlarvas de camarón ( $P_{11}$ ) a razón de  $7500 \text{ pL/m}^3$  en cada uno de las unidades experimentales. Para la etapa de preengorda la razón de siembra fue de  $250 \text{ pL/m}^3$  utilizando los organismos que sobrevivieron en la primera etapa del experimento.

Todos los tanques de todos los sistemas se mantuvieron con aireación constante. Tanto el proceso de maternización como el de preengorda tuvieron una duración de 30 días

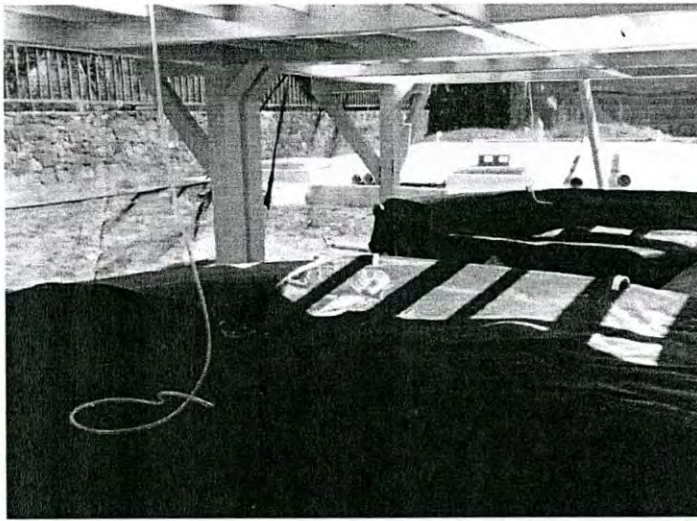
En todos los tratamientos se adiciono alimento balanceado de una marca comercial el cual contenía un 40 % de proteína cruda, y se proporcionó a razón de un 8 % del peso húmedo de los camarones.

Es importante mencionar que en este experimento se trabajó con cero por ciento de recambio de agua, solo se repuso el volumen evaporado dos veces por semana. Por otro lado no se proporcionó *Artemia* en ninguno de los tratamientos.

Todas las unidades experimentales fueron protegidas parcialmente con mallas para evitar la sobre exposición al sol y por ende la elevación de la temperatura (Figura 5).



A



B

Figura 5. Sistema de cultivo autotrófico y control (A), sistema de cultivo heterotrófico (B).

### **III.5 Evaluación de la respuesta productiva**

#### **III.5.1 Crecimiento.**

Cada semana se tomaron 30 organismos de cada una de las unidades experimentales, y se evaluó el peso en base húmeda, y la talla.

Se calculó el crecimiento total mediante la fórmula:

$$CT = Pf - Pi$$

Donde Pf es el peso final y Pi es el peso inicial

Se determinó la tasa de crecimiento específica de a través de la siguiente fórmula:

$$TCE = 100(\log n \text{ del peso final} - \ln \text{ del peso inicial})/T1-T2$$

#### **III.5.2 Supervivencia, Biomasa y Factor de Conversión Alimenticia.**

Al final del experimento se contaron los organismos presentes en cada tanque para determinar la supervivencia y se pesaron para evaluar la biomasa final.

La tasa de conversión alimenticia Se calculo mediante la fórmula:

$$TCE = \text{peso del alimento suministrado/peso de la biomasa cosechada}$$

### **III.6 Parámetros fisicoquímicos.**

La temperatura, la salinidad, el pH, el oxígeno disuelto, el nitrógeno amoniacal total (NAT), y la concentración de clorofila se evaluaron diariamente utilizando un sensor multiparamétrico YSI6600 (Yellow Springs, Ohio, USA).

### **III.7 Concentración celular de microalgas.**

Las muestras para los conteos celulares fueron tomadas una vez en la cosecha de los cultivos. Estas muestras se fijaron con lugol y se contaron inmediatamente después del muestreo en un microscopio compuesto utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer. El factor de dilución fue de 10,000 ya que las



dimensiones de cada cuadrícula mayor, son 1mm x 1mm x 0.1mm (profundidad), lo cual representa un volumen de  $0.1\text{mm}^3$ , equivalentes a 0.1 mL por lo cual se debe de multiplicar por 10,000, para obtener la concentración en 1 mL. (López-Elías *et al.*, 1995)

### **III.8 Actividad enzimática digestiva.**

Muestras de 20 camarones de cada tratamiento fueron analizados al final del experimento para evaluar la fisiología digestiva en términos de actividad de tripsina, actividad de amilasa y actividad de lipasas.

Las muestras de cada tratamiento se homogeneizaron en 3 volúmenes de agua destilada. El homogeneizado se centrifugó a 11,300 gravedades a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se utilizó para las siguientes determinaciones:

#### **III.8.1 Proteína soluble.**

A 1 mL de la muestra se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford, y se leyó absorbancia a 595 nm. Los resultados se reportan como mg proteína/mL de extracto proteico, corriéndose a la vez una curva estándar con albúmina (Bradford, 1976).

#### **III.8.2 Actividad Tipo-Tripsina.**

Se usó como sustrato Benzoil-Arg-*p*-Nitroanilida (BAPNA), se disolvió en 1 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración 1 mM, y se aforó a 100 mL con buffer TRIS 50 mM pH 7.5, conteniendo 20 mM  $\text{CaCl}_2$ . A 1.25 mL de la solución de sustrato se le agrego 10  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, después de 10 min se detuvo la reacción con 0.25 ml de ácido acético 30%, y se leerá la absorbancia a 410 nm. La actividad de tripsina se reportará como unidades de actividad ( $\text{Abs}_{410}/\text{min}$ )/mg de proteína (Erlanger *et al.*, 1961).

#### **III.8.3 Actividad de amilasa.**

Se usó almidón como sustrato, se mezclaron 5 mL del extracto enzimático, 500 mL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, y 500 mL de almidón soluble 1 %, después de 10 min

de incubación a 37 °C, se adicionaron 200 mL de carbonato de sodio 2 N, y 1.5 mL de DNS, se agitaron los tubos y se calentaron a ebullición en baño maría por 15 min, posteriormente se adicionaron 7.3 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia a 550 nm, y se corrió un blanco a la vez. Las unidades de amilasa se reportan como unidades (Abs<sub>550</sub>/min)/ mg de proteína (Vega-Villasante *et al.*, 1993).

#### III.8.4 Actividad de lipasa

Se usó  $\beta$ -Naftil caprilato como sustrato, se mezclaron 100 $\mu$ L de tauracolato de sodio 100 mM, 1,900  $\mu$ L de buffer Tris 50 mM pH 7.2, 10  $\mu$ L del extracto enzimático y 20  $\mu$ L de  $\beta$ -Naftil caprilato 200 mM, después de 30 min de incubación a 37 ° C, se adicionaron a la mezcla de reacción, 20  $\mu$ L de Fast Blue BB 100 mM, y después de 5 min, se agregaron 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético 0.72 N. y 2.71 mL de etanol:acetato de etilo (1:1). Se leyó la absorbancia a 540 nm. Las unidades de lipasa se reportan como unidades (Abs<sub>540</sub>/min)/mg de proteína (Versaw *et al.*, 1989).

### III.9 Parámetros hemáticos y actividad superóxido dismutasa (SOD).

Al final de cada etapa del experimento de crecimiento se extrajeron muestras de hemolinfa de 30 organismos mantenidos bajo los diferentes tratamientos. Se determinaron proteínas totales, acilglicéridos, lípidos, colesterol, glucosa y actividad superóxido dismutasa (SOD), como único parámetro de condición inmune. Para SOD se utilizó un kit comercial Sigma-Aldrich y para los demás parámetros se utilizaron kits comerciales de la marca Randox (Randox Laboratories, Oceanside, CA, USA). Las lecturas fueron hechas en un lector de microplacas Thermo Scientific.

Para el caso de proteínas totales, colesterol, acilglicéridos y glucosa se tomaron 10  $\mu$ l de la muestra y se le adicionó 200 $\mu$ L del respectivo reactivo, se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, y se leyó en a 550 nm para el caso de proteínas totales y 490 nm para el resto de los metabolitos.



### III.10 Análisis proximal de los bioflóculos.

#### III.10.1 Proteína.

Para la determinación de proteínas totales, se filtraron 10 mL de agua del cultivo autotrófico, del heterotrófico y del control, en filtros GFC de 7 cm de diámetro por triplicado y se sometieron a una hidrólisis alcalina con NaOH al 0.1 N.

Se utilizaron una serie de soluciones:

- **Solución 1:** una mezcla de Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) al 2% en Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0.1 N; Sulfato Cuprico Pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al 0.5 % y por último una solución de Tartrato de sodio y potasio al 1 %, mezclados en una proporción de 100:1:1 respectivamente.
- **Solución 2:** Reactivo comercial de Folin Ciocalteu y agua destilada mezclados en un proporción 1:1. Se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido de la hidrólisis alcalina. Como blanco se utilizó NaOH. Se adicionó 5 mL de la solución 1 a cada tubo, inclusive a los blancos. Se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Se adicionó 0.5 mL de la solución 2 a cada tubo. Se agitaron los tubos en vortex (hasta generar color azul) y se dejó reposar por una hora. La lectura se tomó con un espectrofotómetro a 750 nm de longitud de onda.

#### III.10.2 Lípidos.

Para la determinación de lípidos, se filtraron 10 mL de agua del cultivo autotrófico, del heterotrófico y del control, en filtros GFC de 2.5 cm de diámetro, por triplicado y se sometieron a una extracción en frío con cloroformo, metanol y agua. Los concentrados obtenidos de la extracción se sometieron al siguiente procedimiento:

- A la muestra (lípidos), se agregó dicromato ácido de potasio al 2% en ácido sulfúrico ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).
- Se incubó en baño maría a 100 °C por 15 minutos.
- Pasado el tiempo de incubación, se enfrió a temperatura ambiente.
- Se agregaron 4.5 mL de agua destilada a cada muestra y se mezcló vigorosamente

- Debido a que se genera calor por la reacción exotérmica, se dejó enfriar nuevamente a temperatura ambiente.
- Se tomó la densidad óptica de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

Es en base a la gran importancia y el potencial que tiene la implementación de estos sistemas de producción, tanto en el rubro económico como ambiental, se han desprendido de esta investigación una serie de artículos científicos en total tres, los cuales dan fe de los resultados obtenidos al evaluar los sistemas autotróficos y heterotróficos basados en biopelículas y flóculos respectivamente. Es por ende que se ha recabado esta información en una recopilación de artículos científicos la cual se describe a continuación.

#### IV. RESULTADOS

Como resultados del estudio se generaron 3 artículos científicos (ANEXO) de los cuales los 2 primeros están publicados y el último en proceso de evaluación. En esos 3 artículos, se incluyen los resultados y las discusiones correspondientes a cada uno de los objetivos planteados.

Como resultado del objetivo particular: Evaluar el crecimiento, supervivencia y FCA de los camarones cultivados en sistemas autotróficos y heterotróficos, durante la maternización y la pre-engorda intensivas, se generó la siguiente publicación:

**Becerra-Dórame M.J., Martínez-Córdova L.R., Martínez-Porchas M., López-Elías J. 2011. Evaluation of Autotrophic and Heterotrophic Microcosm-based Systems on the Production Response of *Litopenaeus vannamei* Intensively Nursed without *Artemia* and with Zero Water Exchange. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah, IIC:63.2011.620, 7 pages.**

El objetivo principal del presente artículo fue evaluar sistemas basados en microorganismos autótrofos y heterótrofos en la respuesta productiva del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* durante la maternización intensiva sin *Artemia* y cero recambio de agua.

Dentro de los resultados relevantes obtenidos para esta publicación científica se encontró que no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto. Los valores de pH fueron ligeramente menores en el sistema heterotrófico pero con niveles aceptables para la maternización de la especie, al igual que los valores de temperatura y salinidad. Esto sugiere que respecto a los parámetros de calidad del agua, no se observaron diferencias entre los tratamientos y por lo tanto no debieron influir en los resultados.

Con respecto a la concentración de clorofila a, el sistema heterotrófico presentó valores mucho más bajos que el autotrófico y el control, lo cual es absolutamente lógico, considerando que el primero está basado en la proliferación de microalgas como la base de la cadena trófica.



Similarmente la concentración celular microalgal, considerando conjuntamente cianobacterias y diatomeas, presentó una gran diferencia entre los tratamientos control y autotrófico, en donde se presentaron las mayores densidades, en comparación con el sistema heterotrófico. Las bacterias fueron significativamente más abundantes en el tratamiento heterotrófico ( $1.8 \times 10^5$  células/mL) que en el autotrófico y control ( $<1 \times 10^3$  células/mL).

Los principales grupos taxonómicos asociados a los sustratos artificiales fueron las cianobacterias ( $2.1 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) y las diatomeas en el sistema autotrófico y bacterias heterótrofas y cianobacterias filamentosas en el sistema heterotrófico ( $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ).

Respecto a la respuesta productiva, al final del cultivo, la ganancia en peso fue estadísticamente similar en los tratamientos control y heterotrófico, con un 42% y 34% respectivamente, más altos que en el tratamiento autotrófico. La tasa de conversión alimenticia fue similar en todos los tratamientos.

En conclusión los resultados de este artículo indican que es posible la maternización de *L. vannamei* en sistemas heterotróficos o autotróficos sin la adición de artemia y con cero recambio de agua, mediante la promoción de la biota natural como microalgas o bacterias autotróficas, como una alternativa a los sistemas tradicionales que emplean grandes recambios de agua y el uso de Artemia como principal fuente de alimentación en la maternización e inicios de la pre-engorda. Una disminución o eliminación del uso de Artemia para la maternización de postlarvas implicarían una disminución en los costos operativos. La eliminación del recambio de agua también representa un ahorro en costos operativos y adicionalmente propicia en el reciclaje de nutrientes, lo que aumenta la eficiencia de su utilización. Estos sistemas son más bioseguros debido a que la introducción de patógenos es limitada y el impacto causado por los efluentes se elimina.

Como resultado del cumplimiento del objetivo: Evaluar la actividad enzimática digestiva, condición nutricional y respuesta inmune del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), en cada etapa y en cada uno de los dos sistemas, se generaron las dos siguientes publicaciones:

**Becerra-Dórame M.J., Martínez-Porchas M., Martínez-Córdova L.R., Rivas-Vega M.E., Porchas-Cornejo M.A. 2012. Production Response and Digestive Enzymatic Activity of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Intensively Pregrown in Microbial Heterotrophic and Autotrophic-Based Systems. The Scientific World Journal. Volume 2012. Article ID 723654, 6 pages. Article in press.**

El objetivo principal del este estudio fue evaluar el efecto de sistemas basados en la promoción de organismos autótrofos, sobre la respuesta productiva y la fisiología digestiva del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* preengordado intensivamente.

Dentro de los resultados obtenidos en esta investigación destaca el que no hubo diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto, temperatura y salinidad entre los dos tratamientos y el control. El pH fue significativamente menor en el sistema heterotrófico (SH) en comparación con el sistema autotrófico (SA) y el control (C), todos los parámetros estuvieron dentro de los intervalos aceptables para la preengorda del camarón blanco.

En cuanto a la respuesta productiva del camarón, se observaron algunas diferencias significativas entre los tratamientos. La ganancia en peso fue significativamente mayor en el tratamiento control, lo que básicamente se debió a una menor sobrevivencia y por lo tanto una menor biomasa; como ya ha sido ampliamente documentado en diversos trabajos que se incluyen en el artículo, normalmente hay una relación inversa entre crecimiento y densidad de organismos en el sistema. La misma tendencia se observó para la tasa de crecimiento específico (SCE). Por el contrario, la supervivencia fue mejor en los sistemas autotrófico y heterotrófico, entre los cuales no se observaron diferencias significativas. El factor de conversión alimenticia fue bajo en los dos tratamientos y el control, pero los valores más bajos se registraron en los sistemas basados en bioflóculos y biopelículas.



En lo que respecta a la actividad enzimática digestiva, la actividad de tripsina fue ligeramente superior en el sistema heterotrófico, aunque sin diferencias significativas respecto al sistema autotrófico y el control. La actividad de la amilasa resultó ser superior en el sistema heterotrófico en comparación con el autotrófico y el control. La actividad de la lipasa en cambio fue más baja en el sistema heterotrófico, pero sin diferencias significativas con los otros dos tratamientos.

En conclusión los resultados de este artículo sugieren que el uso de los sistemas autotróficos y heterotróficos basados en biopelículas y bioflóculos en la preengorda de *L. vannamei*, tienen un efecto en la sobrevivencia del camarón y modifican la actividad de algunas de las enzimas digestivas del organismo

El segundo artículo es el siguiente:

**Becerra-Dórame M.J., Martínez-Córdova L.R., Martínez-Porchas M., Hernández-López J., López-Elías J.A., Mendoza-Cano F. 2012. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the intensive pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. Aquaculture Research.**

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de sistemas basados en organismos autótrofos y heterótrofos sin la inclusión de bacterias probióticas en el crecimiento y estatus fisiológico, en la preengorda intensiva del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Dentro de los resultados obtenidos en este trabajo, destaca que en la calidad del agua no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para nitritos (NO<sub>2</sub>) y nitrógeno amoniacal total (NAT), y todos ellos están dentro de los rangos de seguridad para el cultivo de la especie.

En cuanto a los parámetros de producción, se observaron diferencias entre los tratamientos solamente en cuanto a la supervivencia, la cual fue superior en el sistema los autotrófico (SA) y heterotrófico (SH) comparado con el control.

En relación a los parámetros hemáticos los niveles de proteína y colesterol fueron superiores en el sistema autotrófico comparado con el heterotrófico. Los niveles de colesterol fueron estadísticamente similares entre los sistemas autótrofo y heterótrofo pero ambos diferentes del control que presentó las menores concentraciones. En cuanto a glucosa y acilglicéridos, ambos fueron significativamente más altos en el sistema heterotrófico comparado con el control pero sin diferencias con el autotrófico. Esto probablemente se relaciona con una mayor cantidad de carbono orgánico que es aportado a este sistema con la melaza y que es aprovechado por las bacterias heterotróficas y posteriormente por los camarones al consumirlas. Estos resultados revelan una mejor condición fisiológica en los organismos cultivados en los sistemas en la que se promovió la abundancia de micro organismos ya sea autotróficos o heterotróficos, coincidiendo con lo reportado por otros autores.

Los niveles de lactato fueron más elevados en los organismos preengordados en el sistema control que en aquellos que lo hicieron en los sistemas autotrófico y heterotrófico. Esto pudiera sugerir un menor grado de estrés en los camarones cultivados en estos dos sistemas; sin embargo este parámetro por sí solo no es suficiente para afirmar sólidamente esto. Sería necesario realizar otros estudios tales como la presencia de proteínas de estrés.

La actividad Super Oxido Dismutasa (SOD) fue superior en la hemolinfa de los camarones del sistema heterotrófico después en los del autotrófico y por último en los del tratamiento control. Este resultado, aunque por sí solo no es suficiente sugeriría preliminarmente, una mejor condición inmune en los organismos preengordados en los sistemas basados en biopelículas y bioflóculos; sin embargo, se considera necesario realizar otras mediciones adicionales, tales como conteo de hemocitos, fenoloxidasa, profenoloxidasa, entre otros, para poder sustentar con mayor evidencia científica esta aseveración.

## V. CONCLUSIONES.

En base a los resultados del estudio completo, contenidos en los tres artículos adjuntos, se pudiera concluir de manera general que:

Es factible la maternización y preengorda del camarón blanco del Pacífico en sistemas basados en micro organismos tanto autótrofos como heterótrofos, asociados a biopelículas y bioflóculos.

La respuesta productiva en ambos sistemas solo se vio mejorada en términos de sobrevivencia con respecto al control. El factor de conversión alimenticia en los sistemas autotrófico y heterotrófico, fue muy bajo tanto en la maternización como en la preengorda, lo cual sugiere un aprovechamiento efectivo de los microorganismos asociados a las biopelículas y los bioflóculos.

En cuanto a la actividad enzimática digestiva aunque no presentó en todos los casos diferencias significativas, la tendencia indicó ser mayor en los sistemas basados en micro organismos, al compararlos con el control. La condición fisiológica, en términos de parámetros hemáticos pareció ser mejor en los sistemas autotrófico y heterotrófico en comparación con el control. La condición inmune, basada solamente en la actividad SOD, indicaría ser mejor en los sistemas heterotrófico y autotrófico, que en el control, sin embargo mayores evidencias son necesarias.



## VI. LITERATURA CITADA

- AOAC INTERNATIONAL. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1094 pp.
- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, 176, 227-235.
- Avnimelech Y., Verdegem M.C.J., Kurup M. and P. Keshavanath, 2008. Sustainable land-based aquaculture: rational utilization of water, land and feed resources. *Medit. Aquacult. J.*, 1:45-55.
- Ballester, E., Wasielesky, W., Cavalli, R., Santos, M. and Abreu, P. 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistemas de berçário. *Atlântica*, 25,117-122).
- Ballester E.L.C., Abreu P.C., Cavalli R.O., Emerenciano M., Abreu L. and W. Wasielesky, 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in zero water exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquacult. Nutr.*, 16:163-172.
- Becerra Dórame M.J., Martínez Córdova L.R., Martínez Porchas M., López Elías J. 2011. Evaluation of Autotrophic and Heterotrophic Microcosm-based Systems on the Production Response of *Litopenaeus vannamei* Intensively Nursed without *Artemia* and with Zero Water Exchange. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, IIC:63, 7 pages.
- Burford, M., Smith D., Tarbrett S., Thompson, P., Barllay, M. and Toscas, P. 2004. The effect of dietary protein on the growth and survival of the shrimp *Penaeus monodon* in outdoor tanks. *Aquac. Nutr.*, 10: 15-23.
- Burford M.A., Sellars M.J., Arnold S.J., Crocos P.J. and N.P. Preston, 2004b. Contribution of natural biota associated with substrates to the nutritional requirements of the post-larval shrimp, *P. esculentus* (Haswell) in high-density rearing systems. *Aquacult. Res.*, 35:508-515.
- Coman G.J., Crocos P.J., Preston N.P. and D. Fielder, 2004. The effects of density on the growth and survival of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 229:215-223.



- Chiu, C-H., Guu, Y-K., Liu, C-H., Pan, T-M. & Cheng, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum* Fish & Shellfish Immunology 23 (2007) 364e377
- Crispim M.C., Vieira A.C.B., Coelho S.F.M. and A.M.A. Medeiros, 2007. Nutrient uptake efficiency by macrophyte and biofilm: practical strategies for small-scale fish farming. *Biol. Limnol.*, 21:387-391.
- D'Abramo, L.R., D.E. Conklin y D.M. Akiyama (Eds). 1997. Crustacean nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6. World Aquaculture Society.
- Decamp, O., Conquest, L., Forster and Tacon, A. G. 2002. The nutrition and feeding of marine shrimp within zero-water exchange aquaculture production systems: role of eukaryotic microorganisms. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 5: 79-84.
- De Schryver, P.D., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W., 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277:125–137.
- Ebeling, J.M. Timmons, M. and Bisogni, J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346-358.
- Erlanger, Kokowsky, y Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. *Arch. Biochemical Biophysics*, 95:271-278.
- Horowitz, S and Horowitz, A. 2002. Microbial intervention in Aquaculture. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 9: 119-129.
- Jirsa D.O., Davis D.A. and C.R. Arnold, 2007. Effects of dietary nutrient density on water quality and growth of red drum *Sciaenops ocellatus* in closed systems. *J. World Aquacult. Soc.*, 28:68-78.
- Jory, D.E. 2000. General concerns for managements of biota in progress shrimp ponds. *Aquaculture Magazine* 26(4):76-80.

- Khatoon H., Banerjee S., Yusoff F.M. and M. Shariff, 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrates as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquacult. Nutr.*, 15:186-193.
- Leber, K.M., G.W. Dominy, and G.D. Pruder, 1988. Shrimp feeding responses to food web manipulation in experimental growout ponds. Honolulu Hawaii.
- Martínez Córdova, L. 2002.. Camaronicultura: Avances y Tendencias. AGT Editor . México, D.F. 167 p.
- Martínez-Córdova, L. , Campaña-Torres, A. and Porchas-Cornejo, M. 2003. Dietary protein level and food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris* and white shrimp (*L. vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition* 9:155-160.
- Martínez Córdova, L.R. 2009. Camaronicultura Sustentable. Editorial Trillas. México. D.F., Mexico. 176 p.
- Moss, S.M. 2002. Dietary importance of microbes and detritus in penaeid shrimp aquaculture. In: LEE, C-S & P O'BRIEN (eds.) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, Chap. 1: 1-9.
- Moss, K, R and Moss, S.M. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, 35(4): 537-542.
- Rubright, J. S.; J. L. Harrel, H. W. Holcomb, and J. C. Parker. 1981. Response of planktonic and benthic communities to fertilizer and feed applications in shrimp mariculture ponds. *J. World Maricul. Soc.* 12(1):281-299.
- Samocho, T. M., Patnaik, S., Speed, M., Ali, A.M., Burger, J.M., Almeida, R.V., Ayub, Z., Harisanto, M., Horowitz, A. and Brock, D.L. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Eng.*, 36, 184-191.
- Silva, C.F., Ballester, E., Monserrat, J., Geracitano, L., Wasielesky, W. Jr & Abreu, P.C. (2008) Contribution of microorganisms to the biofilm nutritional quality: protein and lipid contents. *Aquaculture Nutrition*, 14, 507–514.

- Sookying, D. and Davis, A.D. 2011. Pond production of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed high levels of soybean meal in various combinations. *Aquaculture*, 319:141-149.
- Tacon, A, 2000. Rendered animal bioproducts: a necessity in aquafeeds for the new millennium. *The Global Aquaculture Advocate* 3(2):15-16.
- Thompson, F.L, Abreu, P.C. and Wasielesky, WJr. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., Liu, C.H. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco y R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106 B.
- White, D. 1986. Biological principles of pond culture. Sediment and Benthos. En: E. Lanan et a. (eds.). Principles and Practices of pond Aquaculture. Oregon State Univ. Press. Oregon. pp. 15-19.
- Yufera, M., A. Rodríguez and L. M. Lubian. 1984. Zooplankton ingestión and feeding behavior of *Penaeus kerathurus* larvae reared in the laboratory. *Aquaculture* 42:217-224.
- Zelaya O., Davis A. and D. Rouse, 2007. The influence of *Artemia* and algal supplements during the nursery phase of rearing Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 38:486-496.
- Zendejas Hernández, J. (1994). La camaronicultura en México. Pag. 1-12 En: pp Memorias del Seminario Internacional de Camaronicultura, Camarón 94. Mazatlán, México.
- Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., and Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252: 516–524.
- Zhou, X., Wang, Y. and Wei-fen, L. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287: 349-353.





The IJA appears exclusively as a peer-reviewed on-line open access journal at <http://www.siamb.org.il>  
Sale of IJA papers is strictly forbidden.



## Evaluation of Autotrophic and Heterotrophic Microcosm-based Systems on the Production Response of *Litopenaeus vannamei* Intensively Nursed without *Artemia* and with Zero Water Exchange

M.J. Becerra-Dórame<sup>1</sup>, L.R. Martínez-Córdova<sup>1\*</sup>, M. Martínez-Porchas<sup>2</sup>, J.A. Lopez-Elías<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Investigación Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Colosio s/n, Building 7G, Hermosillo, Sonora, 83000 Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A.C., Km 0.6 Carretera a La Victoria, Hermosillo, Sonora, México

(Received 12.8.10, Accepted 23.10.10)

Key words: shrimp nursery, autotrophic system, heterotrophic system, zero water exchange

### Abstract

An experiment was conducted for 28 days to evaluate the productive response of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae, intensively nursed in autotrophic or heterotrophic microcosm-based treatments, without *Artemia* and zero water exchange. The autotrophic system was based on the promotion of microalgae as the main primary producers. The heterotrophic system was based on the promotion of bacteria as the main primary producers. The control was fed a conventional diet. Bioflocs and biofilms were used to promote biota in the autotrophic and heterotrophic systems. There were no differences in temperature, salinity, or DO among treatments. The chlorophyll *a* concentration and microalgae density were much greater in the control and autotrophic system than in the heterotrophic. The concentration of heterotrophic bacteria was significantly higher in the heterotrophic than in the autotrophic system and control. Individual weight gain was higher in the control (81±2 mg) and heterotrophic (77±8 mg) treatments than in the autotrophic (58±10 mg) but survival was better in the autotrophic (86%) than control (77%) and heterotrophic (76%) treatments. Final biomass was statistically similar in all treatments, as well as the feed conversion ratio which ranged from 0.65 (heterotrophic) to 0.69 (autotrophic). The increased natural productivity caused a positive productive response in the shrimp postlarvae. Such strategies can be an adequate alternative when *Artemia* is unavailable.

\* Corresponding author. Tel.: +52-662-2592169, e-mail: [lmztz@guaymas.uson.mx](mailto:lmztz@guaymas.uson.mx)



## Research Article

# Production Response and Digestive Enzymatic Activity of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Intensively Pregrown in Microbial Heterotrophic and Autotrophic-Based Systems

Manuel J. Becerra-Dórame,<sup>1</sup> Marcel Martínez-Porchas,<sup>2</sup> Luis R. Martínez-Córdova,<sup>1</sup> Martha E. Rivas-Vega,<sup>3</sup> José A. Lopez-Elias,<sup>1</sup> and Marco A. Porchas-Cornejo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Boulevard. L.D. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Edificio 7G, Hermosillo, Sonora, 83000, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a La Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, Mexico

<sup>3</sup> Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora, Carretera a Huatabampo y Periférico Sur, Navojoa, Sonora, 85870, Mexico

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Guaymas, 85454 Sonora, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis R. Martínez-Córdova, lmtz@guaymas.uson.mx

Received 10 October 2011; Accepted 2 January 2012

Academic Editor: Hinrich Gronemeyer

Copyright © 2012 Manuel J. Becerra-Dórame et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Shrimp postlarvae were reared into different microcosm systems without water exchange; a traditional system based on simple fertilization to improve microalgae concentration (control), an autotrophic system (AS) based on the promotion of biofloc and biofilm by the addition of fertilizer and artificial substrates and a heterotrophic system (HS) based on the promotion of heterotrophic bacteria by the addition of nitrogenous and carbonaceous sources and artificial substrates. Better growth performance and survival were registered in shrimp from the AS and HS compared to the control. Feed conversion ratios were below 0.7 for all treatments, but AS and HS were significantly lower than the control. Regarding digestive performance, no significant differences were observed for trypsin, amylase and lipase activities among AS and control shrimp; however, shrimp from HS showed a higher trypsin and amylase activities, suggesting a higher digestive activity caused by the presence of microbial bioflocs. The presence of biofilm and bioflocs composed by either autotrophic or heterotrophic organisms in combination with formulated feed improved the growth performance and survival of shrimp. Apparently, such combination fits the nutritional requirements of shrimp.

## 1. Introduction

Feed and feeding may represent up to 50% of the operative costs in shrimp aquaculture [1]; these costs could even be higher depending upon the intensity of the culture system. Additionally, unconsumed feed is the main potential source of deterioration on the water quality, impacting the effluent-receiving ecosystems [2]. In order to advance toward the sustainability of aquaculture, it is absolutely necessary to optimize not only the feed formulations but also the feeding practices. One of the most interesting and promising alternatives in this context is the promotion and use of

natural feed, which has proven to provide a high proportion of the nutrients required for farmed shrimp, especially in the semi-intensive systems [3–5].

Up today, organisms from zooplankton communities have been the most used as natural feed for aquaculture purposes [6–8]. Microbiota has been used mostly as probiotic to improve the health status of the farmed organisms, or to maintain adequate environmental conditions within the culture units [9]. Traditionally, bacteria and other microorganisms have not been considered important in the feeding of farmed shrimp, probably because of their small size and biomass. However, their extremely great replication rate and



## SHORT COMMUNICATION

### Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters

Manuel de Jesús Becerra-Dorame<sup>1</sup>, Luis Rafael Martínez-Cordova<sup>1\*</sup>, Marcel Martínez-Porchas<sup>2</sup>, Jorge Hernández-López<sup>3</sup>, José Antonio López-Elías<sup>1</sup> & Fernando Mendoza-Cano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>DICTUS, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora, México

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Hermosillo, Sonora, México

**Correspondence:** L R Martínez-Cordova, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Boulevard Luis Donaldo Colosio s/n, 83000 Hermosillo, SON, México. E-mail: lmtz@guaymas.uson.mx

One of the greatest challenges of today's aquaculture is to produce healthy and nutritionally adequate organisms at the lowest economic and ecological cost. In the case of shrimp aquaculture, the traditional systems with high water exchange ratios and the excessive supplementation of aquafeeds containing high protein levels have caused diverse ecological impacts related to eutrophication, nutrification, uncontrolled blooms of phytoplankton and others (Martínez-Porchas & Martínez-Córdova 2012). Strategies aimed to alleviate or buffer these impacts have been proposed.

Some authors have documented that the use of closed systems using suspended organic matter as feeding source, is highly efficient for shrimp farming; shrimp reared in those systems can grow at a high rates inclusively using low-protein feedstuffs (Decamp, Conquest, Forster & Tacon 2002; Moss 2002). Such strategy can contribute to the reduction in the operative costs and allow the recirculation of nitrogenous metabolites, which are considered as toxic for farmed shrimp.

The importance of natural feed and the benefits achieved through the adequate promotion and utilization of biota in different aquaculture systems have been documented (Ballester, Abreu, Cavalli, Emerenciano, Abreu & Wasielesky 2010). In this

context, the most used organisms have been those from phytoplankton, zooplankton and benthic communities. The use of bacterial communities as natural feed has not been a popular strategy during the last decades; however, recent findings have revealed their great and underestimated contribution to the nutrition requirements of crustaceans (Ballester *et al.* 2010). Therefore, the use of bacterial flocs and/or biofilms has acquired more and more importance for the culture of fish and shrimp (De Schryver, Crab, Defoirdt, Boon & Verstraete 2008). In addition, the presence of bacterial aggregates has demonstrated to remove some nitrogenous and phosphorous metabolites from the column water (Audelo-Naranjo, Martínez-Córdova, Voltolina & Gomez-Jimenez 2011).

Growth performance and physiological status of shrimp depend on the quantity and quality of the feed ingested and assimilated; in particular, the physiological status can be evaluated by monitoring specific haemolymph parameters (Pascual, Arena, Cuzon, Gaxiola, Taboada, Valenzuela & Rosas 2004). Microorganisms associated with biofilm and biofloc are known to have an excellent nutritional composition, i.e. high quality proteins with adequate amino acid profile, highly unsaturated fatty acids and vitamins (Burford, Thompson,